

· 临床论著 ·

鼻咽癌放疗后阴虚证患者口腔微生态与舌象变化研究

钱 祥¹ 甄宏德² 傅晓璇¹ 陈 卓¹ 张爱琴¹

摘要 **目的** 观察鼻咽癌放疗后阴虚证患者口腔微生态和舌象变化。**方法** 选择阴虚证鼻咽癌患者 10 例作为患者组,选择健康志愿者 10 名作为健康组,收集两组唾液标本,用 16S rDNA 技术检测口腔微生态。采集两组舌象照片,采用 L×a×b×色彩模型提取舌尖、舌边、舌中和舌根的色彩值,比较患者和健康人舌色差异。**结果** 健康组与患者组口腔微生态差异有统计学意义($R=0.446, P=0.001$)。两组口腔菌群的优势菌属包括链球菌属(*Streptococcus*)、奈瑟氏菌属(*Neisseria*)、嗜血菌属(*Haemophilus*)、*Rothia*、普氏菌属(*Prevotella*)等。链球菌属、普氏菌属、奈瑟氏菌属、韦荣球菌属(*Veillonella*)、嗜血菌属是鼻咽癌患者放疗后具有显著差异的菌属($P<0.01$)。与健康组比较,患者组舌尖颜色 L 值和 b 值降低($P<0.01$),舌边 b 值和舌中 L 值降低($P<0.05$)。**结论** 放疗后阴虚证鼻咽癌患者的舌色和口腔微生态显著变化,链球菌属是患者与健康人相比丰度差异最显著的菌属。

关键词 鼻咽癌;放疗;口腔微生态;阴虚证;舌象

Changes of Oral Microecology and Tongue Image of Yin Deficiency Patients with Nasopharyngeal Carcinoma After Radiotherapy

QIAN Xiang¹, ZHEN Hong-de², FU Xiao-xuan¹, CHEN Zhuo¹, and ZHANG Ai-qin¹ 1 Department of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou (310022); 2 Nanyuan Community Health Center, Yuhang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hangzhou(311100)

ABSTRACT **Objective** To observe the changes of oral micro-ecology and tongue image in patients with yin deficiency after radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. **Methods** Ten patients with yin deficiency nasopharyngeal carcinoma were selected as the patient group, and ten healthy volunteers were selected as the healthy group. Their saliva samples were collected and tested by 16S rDNA technology. Photographs of tongue images were taken and the color values of the tip of the tongue, the edges of the tongue, the middle of the tongue and the root of the tongue were extracted using the L×a×b×color model of the International Commission on Illumination to compare the differences in tongue color between the patient and the healthy person. **Results** The *R* value of Anosim analysis was 0.446 ($P=0.001$), the difference between groups was greater than the difference within the group. The dominant species of the oral flora in both groups included *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Rothia*, *Prevotella* at the level of genus. *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Veillonella* and *Haemophilus* were genus with significant differences after radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma. Compared with healthy group, the L-value and b-value of the tongue tip of the patient group were significantly lower ($P<0.01$), and the b-value of the tongue edges and the L-value in the middle of the tongue were also significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusions** The color of tongue and oral micro-ecology of patients with nasopharyngeal carcinoma changed significantly after radiotherapy. *Streptococcus* might be the most prominent genus of patients compared with healthy people.

KEYWORDS nasopharyngeal carcinoma; radiotherapy; oral microecology; yin deficiency; tongue manifestation

作者单位: 1. 浙江省肿瘤医院名中医馆(杭州 310022); 2. 杭州市余杭区中西医结合医院南苑社区卫生服务中心(杭州 311100)

通讯作者: 张爱琴, Tel: 0571-88122515, E-mail: zhanghaojianbb@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200831. 027

中国鼻咽癌发病人数约占全球一半^[1],放疗是鼻咽癌首选的根治方法,但可产生各种急慢性不良反应,包括口腔黏膜炎、吞咽困难、声音嘶哑、味觉减退、放射性龋齿、皮肤脱屑和口腔干燥症等^[2]。这些不良反应严重影响患者的生活质量,且治疗效果欠佳。急性期黏膜炎持续时间的增加成为晚期黏膜反应的独立危险因素^[3]。因此,预见和治疗急性并发症显得尤为重要。口腔菌群有超过 700 种常见种系型,菌群结构因口腔内的位置而异,其变化与口腔疾病密切相关^[4]。

中医学的基础理论与现代微生物学有着许多共同之处,我国微生物学创始人之一的魏曦教授曾说:“微生物学很可能成为打开中医奥秘大门的一把金钥匙”^[5]。从理论和实践上去探索中医学与微生物学的关系,是我国微生物学研究的特色之一。

中医诊治疾病重视望闻问切,更是讲究舌苔的变化。中医学理论认为舌象反映了五脏六腑的生理功能和病理状态,反映机体盛衰、病邪深浅、邪气性质和疾病的转归和预后。正如《丹溪心法·能合脉色可以万全》曰:“有诸内者,必形诸外”^[6]。

放射性口腔炎的患者往往出现舌色偏红的情况,其在放疗并发症的预测方面存在潜在价值。长期的临床观察显示,放射线也属于一种火热毒邪^[7]。火为阳邪,“火曰炎上”,其性炎热升腾,故见口咽鼻及头部症状;火热易伤津耗气,损伤阴液,故见口渴喜饮,咽干口燥,甚则黏膜溃烂,小便短赤,大便秘结,舌红,少苔或无苔,干燥如镜面等;火热易生风动血,血败肉腐成脓,故出现鼻衄、耳鸣、放射性皮炎、放射性黏膜炎等。综上,鼻咽癌放疗后的基本病机为热毒壅盛、阴虚燥热。因此,本研究观察阴虚证鼻咽癌患者放疗后口腔微生物和舌象的变化,并探究其对于放疗不良反应的预测价值。

资料与方法

1 诊断标准 经组织病理学和/或细胞学证实为原发性鼻咽癌^[8]。符合《中医临床诊疗术语·证候部分》阴虚证诊断标准^[9]。

2 纳入、排除及脱落标准 纳入标准:符合诊断标准;接受放疗 1 年以上;无其他恶性肿瘤个人史;符合中医辨证标准;根据放射治疗肿瘤学组/欧洲癌症研究和治疗组织(Radiation Therapy Oncology Group/European Organization for Research and Treatment of Cancer, RTOG/EORTC)标准评估^[10],持续存在 1-2 级放疗晚期不良反应;年龄 18~70 岁;患者本人同意并签署知情同意书。排除标准:近 3 周

内使用过抗生素治疗;有精神疾病,无完全民事行为能力。脱落标准:患者依从性差;患者要求终止试验。

3 一般资料 本研究经浙江省肿瘤医院伦理委员会审核(No.IRB-2020-55)。选择 2017 年 1—6 月就诊于浙江省肿瘤医院台州院区的患者 10 例作为患者组。10 例患者均经病理诊断为鳞癌,性别比男:女 7:3,年龄 46~62 岁,平均年龄(53.8±5.00)岁。4 例处于放疗后 1 年内,6 例处于放疗后 1~2 年。同时期招募健康志愿者 10 名作为健康组,要求近 3 周内无感染性疾病,未使用抗生素。

4 观察指标及方法

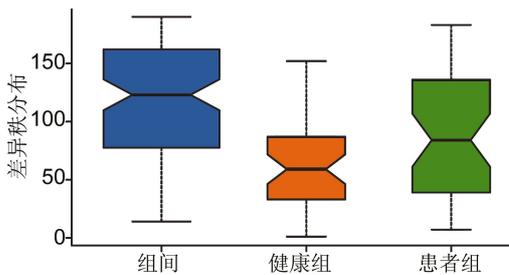
4.1 口腔微生态分析患者在浙江省肿瘤医院台州院区中医科就诊时于上午 10:00-11:00 留取唾液标本 2~3 mL,将 DNA 稳定剂加到唾液中,密封后,做好样品标记,-80℃保存。取解冻后的样品,以 12 000 r/min 转速(13 400×g)离心 5 min,后按照 MiSeq Reagent Kit v3 说明书进行 DNA 提取。以 Invitrogen Qubit Spectrophotometer 进行 DNA 质检。16S rDNA 扩增区域选择 V3-V4 区,引物信息 Forward primer:5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3', Reverse primer:5'-GACTACHVGGGTATCTA-ATCC-3',按照 Roche Light Cycler 96 说明书进行实时 PCR,进行 16S(细菌或古菌)扩增。按 Agilent 2100 Bioanalyzer 说明书进行文库质控后,多个样本文库进行混合。利用 MiSeq Benchtop Sequencer 平台(Illumina 公司)对 16S rDNA 高变区(V3-V4 区)进行测序。为了保证分析结果的准确性,对有效序列进行进一步过滤,得到最终用于后续分析的优质序列。对序列以 0.97 的相似度进行归类(cluster),得到用于后续分析的人为分类单元(operational taxonomic units, OTU)。然后对 OTU 进行精简处理,选取每个类中丰度最高的序列为代表序列,将代表序列用 RDP-classifier 软件对序列进行物种注释,得到每个样品中各个 OTU 的丰度表。根据此表,进行组间差异、菌群结构和物种间相互关系的分析。

4.2 舌象颜色分析 在用日光灯保持明亮环境的中医门诊诊室上午 10:00—11:00,由甄宏德用尼康 D3300 相机拍摄患者舌象照片 3 张,志愿者的舌象照片在 2017 年 6 月 16 日上午 11:00 左右空腹状态时由甄宏德用上述同款相机拍摄,选取其中最清晰的 1 张用作舌色差异分析。以 Kainuma M 等^[11]方法,对拍摄的照片取点,共取舌尖、舌边、舌中和舌根四处。将四处色彩用颜色代码选取器软件 Color Express 读取 CIE Lxaxbx 值,比较患者组和健康组差异。

5 统计学方法 通过 Anosim 相似性分析比较两组间两组 β 多样性。采用秩和检验 *Kruskal-Wallis test* 分析健康人与鼻咽癌患者的物种丰度,用小提琴图展示差异物种的四分位数、95% 置信区间及概率密度,筛选出差异显著的菌属。客观舌象数值以四分位数表示,用 *Shapiro Wilk* 检验数据正态性。满足正态分布且方差齐的,两两比较用 *t* 检验;非正态分布或方差不齐的,采用 *Wilcoxon Mann-Whitney U* 秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组微生态比较(图 1) 健康组与患者组口腔微生态差异有统计学意义 ($R=0.446, P=0.001$)。健康人和鼻咽癌患者属水平有 153 个共有物种,健康人有 59 个特有种,鼻咽癌患者有 18 个特有种。

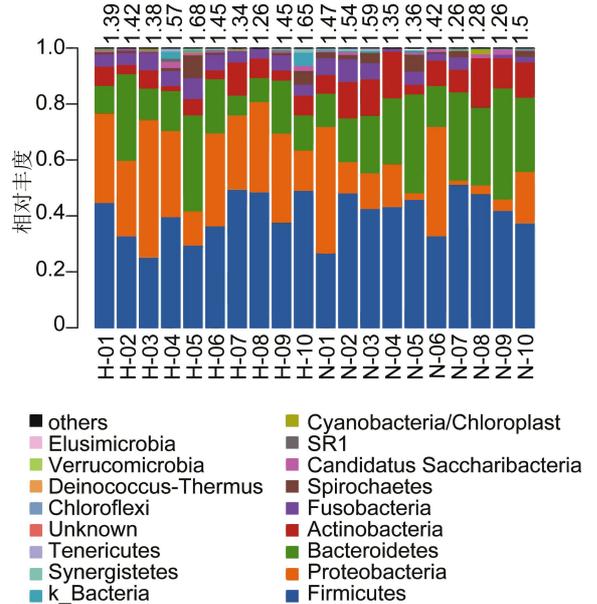


注:组内较其他分组的秩较高时,表明组间差异大于组内差异

图 1 两组 β 多样性 Anosim 分析

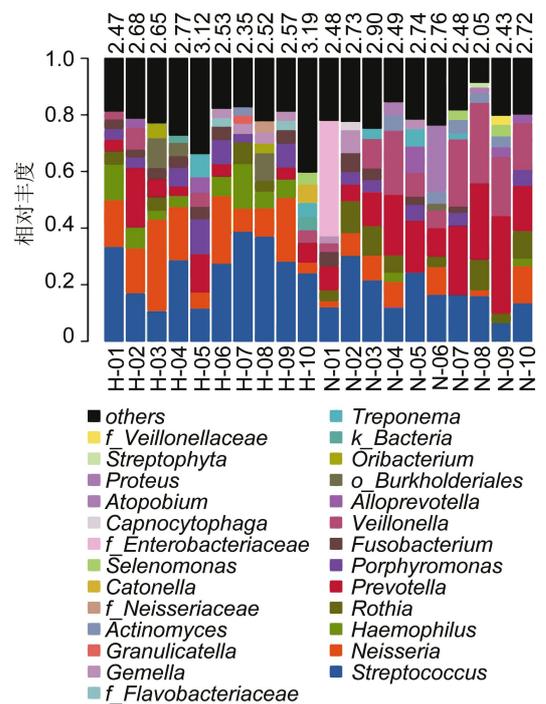
2 菌群结构及优势种系(图 2、3) 两组门水平的优势种系包括厚壁菌门 (*Firmicutes*)、变形杆菌门 (*Proteobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 和 *Fusobacteria* 等,以累积柱状图展示种系丰度占比。属水平的优势种系包括链球菌属 (*Streptococcus*)、奈瑟氏菌属 (*Neisseria*)、嗜血菌属 (*Haemophilus*)、*Rothia*、普氏菌属 (*Prevotella*) 和 *Porphyromonas* 等。

3 两组间有显著差异的种系(图 4、5) 差异性物种分析显示门水平相对丰度前 15 的种系,其中有 4 个差异性种系,分别是变形杆菌门 (*Proteobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、放线菌门 (*Actinobacteria*) 和 SR1。属水平相对丰度前 15 的种系,其中有 6 个差异性种系,分别是链球菌属 (*Streptococcus*)、普氏菌属 (*Prevotella*)、奈瑟氏菌属 (*Neisseria*)、韦荣球菌属 (*Veillonella*)、嗜血菌属 (*Haemophilus*) 和另一只能精确到目水平的种系。



注:部分未能通过 16 S(细菌/古菌)库精确到门水平,“k_”表示精确到界(kingdom)水平

图 2 丰度前 15 的门水平优势种系及其占比



注:部分未能通过 16S(细菌/古菌)库精确到属水平,“f_”表示精确到科(family)水平;“o_”表示精确到目(order)水平;“k_”表示精确到界(kingdom)水平

图 3 丰度前 8 的属水平优势种系及其占比

4 两组舌色比较(图 6) 10 名健康志愿者全部拍摄舌象照片。1 例患者因担心隐私问题,拒绝拍摄舌象照片,9 例患者拍摄了照片。与健康组比较,患者

组舌尖 L 值和 b 值下降 ($P < 0.01$), 舌边 b 值和舌中 L 值下降 ($P < 0.05$)。

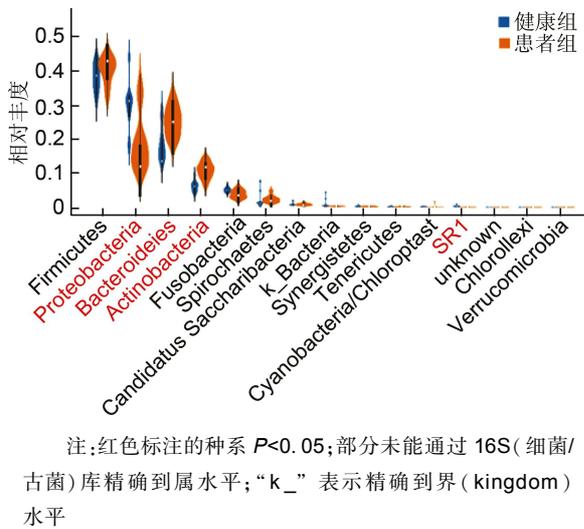


图 4 门水平差异性种系的小提琴图

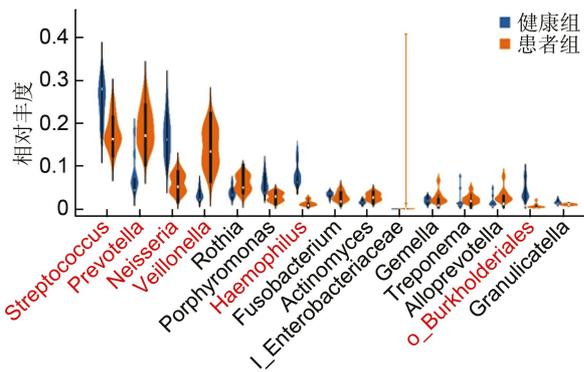
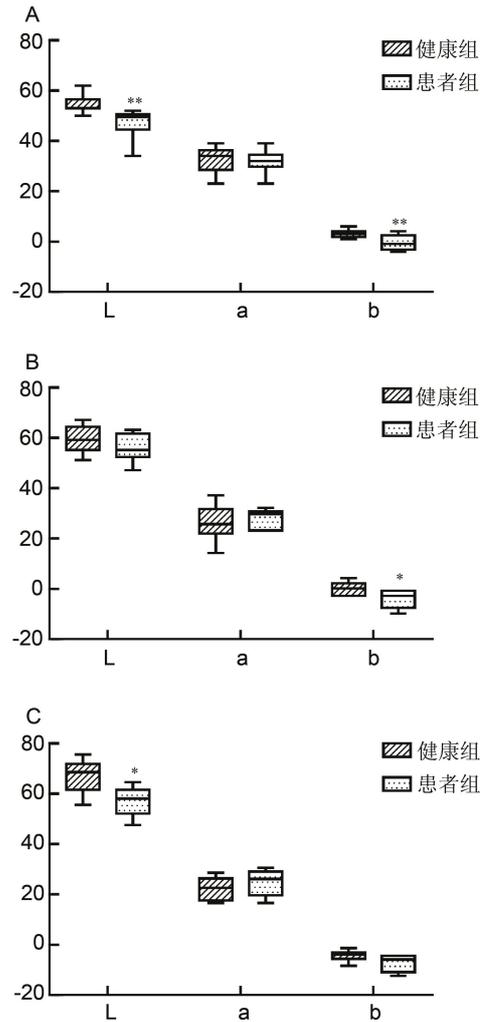


图 5 属水平差异性种系的小提琴图

讨论

放疗晚期并发症是指在放疗完成后 3 个月或更长时间内出现的并发症,与唾液腺的受损密切相关,主要表现为口腔干燥症、吞咽困难、下颌骨骨质疏松症、和听力丧失等^[12]。其中,口腔干燥症是最常见的晚期并发症,其原因在于放疗所致的细胞功能缺陷引起的唾液腺功能减退。本研究中,入组的 10 例患者持续存在 1-2 级黏膜和唾液腺损伤,且都伴有口干症状。

目前,口腔干燥症的治疗主要包括乙酰胆碱激动剂(如毛果芸香碱和西维美林)、唾液替代品、唾液兴奋剂针灸、高压氧治疗以及中医药治疗等,这些方法对特定的患者是有效的^[13]。毛果芸香碱可以改善唾液分泌,减轻了患者放疗后的口腔干燥症状^[14]。但毛果



注:A 为舌尖取值,B 为舌边取值,C 为舌中取值;与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 6 两组舌尖、舌边和舌中的 CIE Lxa×b 值比较

芸香碱存在药效时间短以及支气管痉挛、心动过缓、血管舒张和腹泻等胆碱能刺激引起的不良反应,导致其临床应用受限^[15]。口腔干燥症属于中医燥病的范畴,燥的发生与内伤脏腑有着密切的关系,多由肝肾阴虚、津不上承引起,或由热盛津伤、煎灼津液所致,口腔干燥综合症选择中医治疗对症且效果明显^[16-19]。临证时应中西医结合,在明确病因的前提下,融合中医学及现代医学优势治疗口腔干燥症。

中医学理论认为“五脏化五液,涎为脾之液,唾为肾之液”,即唾液为脾肾所化。历代医家更强调唾液的重要性,通过唾液充盈来判断体质强盛、疾病的预后。陶弘景云:“食玉泉者,能使人延年,除百疾”^[20]。现代医学认为唾液是一种略带酸性(pH 值 6.0~7.0)的,由水(99%)、蛋白质(0.3%)和无机物质(0.2%)组成的透明液体^[21]。唾液检测相较于血液有诸多优点:包括采集难度小,无创,经济,样品处理更安全,易

于运输和储存^[22]。本研究发现,不论是在健康人还是鼻咽癌患者,链球菌属都是口腔微生态中的优势菌群,且鼻咽癌患者链球菌属丰度显著降低。这可能是由于鼻咽癌患者放疗后,唾液流量减少,性状变得更黏稠,同时 pH 值也显著降低。唾液酸化可能使口腔内高变酸/酸性生物的丰度上升,从而影响口腔微生态的变化。

从中医学角度来说,放射治疗是一种热性杀伤物质,主要表现为“阴虚”和“热毒”。鼻咽癌患者放疗后出现口燥咽干、舌红少苔等阴虚毒恋之象,从现代医学角度分析是唾液腺功能受损的表现。放射性口腔干燥症导致口腔内某些部位唾液稀少,引起口腔微生物的异位^[23]。而细菌异位可导致溃疡组织的细菌定植,其细胞壁产物可以激活巨噬细胞,进一步刺激着炎症反应。与此同时,口腔微生物能够影响先天免疫反应,会加剧或延长黏膜炎^[24]。它导致了关键的促炎细胞因子[例如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α)、白细胞介素(interleukin-1 β 和 interleukin-6)]的产生和神经酰胺途径的激活^[25]。此时,口腔黏膜动脉短暂收缩,导致血管扩张和血流加速(炎症充血),口腔黏膜颜色(尤其是舌表面)变红,出现放射性炎症伴有的红色舌^[26]。在本研究中,与健康人相比,放疗后的鼻咽癌患者舌尖、舌中、舌边的颜色发生显著改变。虽然舌根部颜色由于光线问题未能进行分析,但研究结果足以反映放疗与舌色改变的相关性。因部分照片舌根部位光线灰暗且显示不清,放弃了对舌根进行 CIE L \times a \times b 值的提取和分析。由此可见,放射性口腔干燥症、口腔微生态、放射性口腔黏膜炎存在着相互作用。但舌色和口腔微生态能否成为放射性口腔干燥症和放射性口腔黏膜炎的预测因素呢? 本研究发现,鼻咽癌阴虚证患者放疗后的舌象 L 值和 b 值较健康人显著下降,在舌尖部位的下降尤其显著。这些过程均发生在临床表现之前,提示了舌色客观数值在预测放疗副反应方面可能存在一定价值。放疗后的鼻咽癌患者和健康人相比,链球菌属既是口腔菌群中丰度最高的属,又是放疗后鼻咽癌患者于健康人相比差异最大的属。它与放疗并发症存在密切联系:一方面,轻型链球菌的增加与严重黏膜炎的发展有关;另一方面,轻型链球菌和 *Streptococcus oralis* 可促进炎症伤口的愈合。鉴于本研究所采用的 16S rDNA 技术只能精确到属水平。因此,链球菌属的菌种在鼻咽癌患者放疗并发症的预测价值有待进一步探究。

口腔微生态与中医舌诊的关系是一项庞大复杂的系统性研究,需要中医界同仁及科研人员通力合作、仔

细求证。本文从鼻咽癌放疗后阴虚患者口腔微生态变化来阐释舌象变化的机制,进一步探讨微生态变化的深层次原因以及判断预后的价值,为微生态与中医学研究提供新的思路,但在技术层面仍有一些不足之处。在此基础上,笔者将利用系统生物学技术(转录组学、蛋白质组学、代谢组学)进一步挖掘中医学的潜在价值,不断守正创新。

利益冲突:无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7--4.
- [2] Wang P, Zhang M, Ke C, et al. The efficacy and toxicity of induction chemotherapy plus concurrent chemoradiotherapy in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(10): e19360.
- [3] Wang FZ, Chuner J, Lei W, et al. Outcome and long-term efficacy of four facio-cervical fields conformal radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(24): 39756--39765.
- [4] Li Y, Wang K, Zhang B, et al. Salivary mycobiome dysbiosis and its potential impact on bacteriome shifts and host immunity in oral lichen planus [J]. Int J Oral Sci, 2019, 11(2): 13.
- [5] 唐白, 李华军主编. 微生态学现代理论与应用[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2013: 10.
- [6] 元·朱震亨. 丹溪心法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 35.
- [7] 顾田, 贾立群. 恶性肿瘤患者放射性口腔炎的中医治疗进展[J]. 北京中医药, 2018, 37(1): 90--93.
- [8] 李进主编. 中国临床肿瘤学会(CSCO)头颈部肿瘤诊疗指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 12.
- [9] 中华人民共和国技术监督局. 中医临床诊疗术语·证候部分[S]. GB/T16751.2-997. 北京: 中国标准出版社, 1997: 1-2.
- [10] Radiation Therapy Oncology Group, European Organization for Research and Treatment of Cancer. RTOG/EORTC late radiation morbidity scoring schema[EB/OL]. [2019-10-01]. <https://www.rtog.org/ResearchAssociates/AdverseEventReporting/RTOGEORTCLateRadiationMorbidityScoringSchema.aspx> [2020-02-01].
- [11] Kainuma M, Furusyo N, Urita Y, et al. The association between objective tongue color and endoscopic findings: results from the Kyushu and Oki-

- nawa population study (KOPS) [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 372.
- [12] Strojan P, Hutcheson KA, Eisbruch A, et al. Treatment of late sequelae after radiotherapy for head and neck cancer [J]. *Cancer Treat Rev*, 2017, 59: 79–92.
- [13] Lovelace TL, Fox NF, Sood AJ, et al. Management of radiotherapy-induced salivary hypofunction and consequent xerostomia in patients with oral or head and neck cancer; meta-analysis and literature review [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2014, 117(5): 595–607.
- [14] Leveque FG, Montgomery M, Potter D, et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-titration study of oral pilocarpine for treatment of radiation-induced xerostomia in head and neck cancer patients [J]. *J Clin Oncol*, 1993, 11(6): 1124–1131.
- [15] Yang WF, Liao GQ, Hakim SG, et al. Is Pilocarpine effective in preventing radiation-induced xerostomia? A systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2016, 94(3): 503–511.
- [16] 周峰, 陈虎, 曾静. 生津润燥养血颗粒联合硫酸羟氯喹片治疗原发性口腔干燥综合征临床研究 [J]. *新中医*, 2019, 51(3): 213–216.
- [17] 黄初冬, 汤敏中. 中药与鼻咽癌放射治疗研究概述 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 23(11): 1575–1578.
- [18] 陈俏妍, 夏纪严, 韩凌, 等. 滋阴清热法防治阴虚内热证急性放射性口腔炎临床研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(7): 694–698.
- [19] 王跃珍, 张爱琴, 孙晓江, 等. 中药对鼻咽癌放疗后唾液腺功能的影响 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2004, 14(6): 33–34.
- [20] 南朝·陶弘景著. 王家葵校注. 养性延年录 [M]. 北京: 中华书局, 2014: 65.
- [21] De Almeida Pdel V, Gregio AM, Machado MA, et al. Saliva composition and functions: a comprehensive review [J]. *J Contemp Dent Pract*, 2008, 9(3): 72–80.
- [22] Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, et al. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2013, 26(4): 781–791.
- [23] Vasconcelos RM, Sanfilippo N, Paster BJ, et al. Host-microbiome cross-talk in oral mucositis [J]. *J Dent Res*, 2016, 95(7): 725–733.
- [24] Stringer AM, Logan RM. The role of oral flora in the development of chemotherapy-induced oral mucositis [J]. *J Oral Pathol Med*, 2015, 44(2): 81–87.
- [25] Laheij AM, De Soet JJ. Can the oral microflora affect oral ulcerative mucositis? [J]. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2014, 8(2): 180–187.
- [26] Wernner JA, Lippert BM 著. 傅敏, 张丽霞, 叶青译. 耳鼻咽喉头颈部疾病诊疗彩色图谱 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2007.
- (收稿: 2020-02-03 在线: 2020-09-25)
责任编辑: 赵芳芳